

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Sanja Ivanušić

Modeliranje aldolne adicije katalizirane D-fruktoza-6-fosfat
aldolazom A129G

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr.sc. Đurđa Vasić-Rački

Članovi ispitnog povjerenstva: Prof. dr.sc. Đurđa Vasić-Rački

Izv. prof. dr.sc. Zvezdana Findrik Blažević

Izv. prof. dr.sc. Irena Škorić

Zagreb, rujan 2016.

ZAHVALA

Veliko hvala svim profesorima, asistentima, prijateljicama, prijateljima, kolegicama i kolegama koji su mi pomogli tijekom studija, uljepšali studentske dane i učinili ih nezaboravnima.

Hvala asistentici dr.sc. Martini Sudar na pomoći pri izradi rada.

Posebno zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Đurđi Vasić-Rački na prijedlozima, savjetima i podršci prilikom pisanja ovog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, osobito roditeljima na beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi. Hvala vam što ste mi omogućili da studiram ono što najviše volim.

SAŽETAK

U ovom radu proučavana je reakcija aldolne adicije dihidroksiacetona (DHA) na *N*-Cbz-3-aminopropanal katalizirana D-fruktoza-6-fosfat aldolazom A129G, čiji produkt je prekursor za sintezu D-fagomina, prirodnog iminošećera izvanrednih bioloških svojstava te je iz tog razloga reakcija od interesa. Za ovu reakciju napravljeni su modeli u kotlastom, cijevnom i protočno kotlastom reaktoru. Pomoću tih modela predviđene su konverzije, pri različitim procesnim uvjetima u reaktorima. Kao najbolji reaktor za provedbu ove reakcije se pokazao kotlasti reaktor.

Ključne riječi: Enzim, Kinetika Michaelis-Menten, Biotransformacije, Aldolaze, D-fruktoza-6-fosfat aldolaza, FSA A129G, Modeliranje, Reaktori

ABSTRACT

The reaction of aldol addition of dihydroxyacetone (DHA) on the *N*-Cbz-3-D-aminopropanal catalyzed by fructose-6-phosphate aldolase A129G, which reaction product is precursor for the synthesis of D-fagomine, natural iminosugar with remarkable biological properties is investigated in this paper. Because of the very interesting product the reaction is of high interest. The reaction is modelled in batch, plug flow and continuous stirred tank reactor. The conversion of reactants is predicted using the models at various process conditions. The best reactor for this reaction is batch reactor.

Key words: Enzyme, Michaelis-Menten Kinetics, Biotransformations, Aldolase, D-fructose-6-phosphate aldolase, FSA A129G, Modelling, Reactors

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	3
ABSTRACT	4
1. UVOD	7
2. OPĆI DIO.....	8
2.1 Enzimi.....	8
2.1.1. Struktura i svojstva.....	9
2.1.2. Enzimska kinetika	9
2.1.4. Aldolaze	12
2.2. Biotransformacije	15
2.2.1. Reakcije prve faze biotransformacije.....	15
2.2.2. Reakcije druge faze biotransformacije.....	16
2.3 Aldolne reakcije (Adicija - dehidracija)	16
2.4. Reaktori.....	17
2.4.1. Kotlasti (šaržni) reaktor	18
2.4.2 Cijevni reaktor	18
2.4.3. Protočno kotlasti reaktor	19
2.4.4 Bioreaktori za biokatalitičke procese	19
2.4.5 Mikroreaktori	21
3. MATEMATIČKO MODELIRANJE	22
3.1. Matematički model	22
3.2 Scientist.....	22
3.3 Kinetički model kemijske reakcije	23
3.4. Kinetički model aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-3-aminopropanal.....	23
3.4.1. Stabilnost enzima aldolaze.....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1 Kinetički parametri	26
4.2 Kotlasti reaktor	27
4.3 Cijevni reaktor	28
4.4 Protočno kotlasti reaktor.....	31
5. RASPRAVA.....	31
5.1. Kotlasti reaktor	31
5.2. Cijevni reaktor	32

5.3. Protočno kotlasti reaktor	32
6. ZAKLJUČAK	33
7. POPIS SIMBOLA	34
8. LITERATURA	35
9. PRILOZI.....	38
9.1 Matematički model aldolne adicije u kotlastom reaktoru.....	38
9.2 Matematički modeli aldolne adicije u cijevnom reaktoru	39
9.2.1 Matematički modeli aldolne adicije u cijevnom reaktoru uz nezavisnu varijablu τ ..	39
9.2.2 Matematički model aldolne adicije u cijevnom reaktoru uz nezavisnu varijablu V	40
9.2.3. Matematički model aldolne adicije u cijevnom reaktoru uz nezavisnu varijablu L	41
9.2 Matematički model aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru	42
10. ŽIVOTOPIS	43

1. UVOD

Područje biokatalize uključuje primjenu enzima kao katalizatora za organsku sintezu. Katalitička jakost i specifičnost enzima omogućuje im uspješno djelovanje u blagim uvjetima s izuzetnom stereoselektivnošću. Razni enzimi koriste se kao alati pri sintezi, a jedna od najznačajnijih skupina su aldolaze koje kataliziraju reverzibilno nastajanje C-C veze uz visoku enantioselektivnost [1]. Napredak u mikrobiologiji i genetskom inženjerstvu uvelike je povećao dostupnost različitim enzimima [2]. Biotransformacije su kemijske modifikacije spojeva u specifične derivate [3]. Korištene su tijekom povijesti u poljoprivredi, prehrambenoj industriji, proizvodnji kruha, piva, vina, octa, itd. [4]. Posljednjih godina postale su uzbuđujuće područje istraživanja, u kojem se nova dostignuća, otkrića i primjena objavljuju svakodnevno [5]. Razvoj novih i uspješnih biotransformacija interesantan je za farmaciju i medicinu [6]. Aldolaze i transketolaze služe kao vrijedni alati u biokatalitičkoj sintezi za proizvodnju kompleksnih prirodnih i neprirodnih šećera [7]. Enzimska tehnologija u industriji upotrebljava se za jednostavnije biotransformacije u kojima u reakciji sudjeluje samo jedan do dva enzima, a supstrat je relativno čist. U tu svrhu upotrebljavaju se enzimi izolirani iz mikrobnih ili biljnih stanica. Glavne prednosti uporabe enzimskih preparata umjesto mikrobnih stanica su: jednostavnost postupka, rad pri visokoj koncentraciji biokatalizatora, specifičnost biokemijske reakcije bez potrošnje supstrata za tvorbu nusproizvoda, rast i održavanje stanica, te nema otpadne biomase. No, stabilnost enzima je ograničena, osobito pri višekratnoj uporabi što je nedostatak, a posebno se odnosi na enzime koji trebaju specifične kofaktore. Enzimska tehnologija još uvijek traži svoje mjesto u industrijskoj proizvodnji i nalazi ga samo tamo gdje je jeftinija i učinkovitija od mikrobnog, odnosno organsko-kemijske tehnologije. Primjena enzima u industriji istražuje se i nalazi sve širu primjenu, posebno u razgradnji supstrata kao što su proteini, celuloza, hemiceluloza i pektin. Takvi procesi zbivaju se u enzimskim reaktorima koji omogućuju kontrolu i regulaciju optimalnih uvjeta procesa [8]. Enzimi su proteini koji kataliziraju gotovo sve biokemijske reakcije [9]. Da bi uvela neki red u klasifikaciju enzima, međunarodna unija za biokemiju (IUB) osnovala je 1964. enzimsku komisiju sa zadaćom da razvije nomenklaturu enzima, pa su enzimi podijeljeni u šest glavnih skupina, prema tipu reakcija: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze. Te su skupine dalje podijeljene, tako da svaki enzim može biti identificiran konačnim četveroznamenkastim brojem, kojemu prethodi oznaka EC (Enzyme Commission) [10]. Liaze su enzimi koji cijepaju C-C, C-O, C-N i druge veze i stvaraju dvostruke veze, eliminacijom ili dodatkom skupine [11]. Skupini liaza između ostalog pripadaju i enzimi aldolaze [4]. Aldolna reakcija jedan je od važnih sintetičkih postupaka koji se koriste kod

karbonilnih spojeva. Ta se reakcija često primjenjuje i u industriji, tako se na primjer akrolein, polazna sirovina za brojne industrijske procese, može sintetizirati ukrštenom aldolnom reakcijom formaldehida i acetaldehida [9]. U ovom radu proučit će se reakcija aldolne adicije katalizirana enzimom D-fruktoza-6-fosfat aldolazom A129G, te modelirati u kotlastom, protočno kotlastom i cijevnom reaktoru. Svrha modeliranja je definiranje matematičkih modela koji su neophodni za optimizaciju, simulaciju, revitalizaciju i upravljanje procesima i sustavima. Dakle, osnovna svrha modeliranja procesa i sustava je izrada matematičkih modela, koji će u odgovarajućem stupnju točnosti adekvatno opisati proces ili sustav u cilju simulacije varijantnih rješenja, analize i prognoziranja stanja procesa još u fazi projektiranja. Matematički modeli, koji su neophodni za optimizaciju procesa i iznalaženje optimalnih rješenja se trebaju definirati da bi se mogli koristiti za upravljanje datim sustavom, odnosno objektom optimizacije [12]. Svi tehnički proračuni temeljni su na matematičkim formulacijama uzročno-posljedičnih veza, a skup matematičkih objekata koji apstraktno reproduciraju učinke neke uzročno-posljedične veze smatraju se njenim matematičkim modelom [13].

2. OPĆI DIO

2.1 Enzimi

Enzimi su važan dio biotehnologije, a u posljednje vrijeme imaju veliku važnost u industriji. Glavnu ulogu u njihovu razvoju ima mikrobiološka proizvodnja. Izolirani enzimi koji se upotrebljavaju u industrijskim mjerilima većinom su izvanstanični produkti mikroorganizama, zbog toga što ih je lako izolirati te su otporniji na promjene uvjeta u okolišu od unutarstaničnih enzima. Ipak 90 % enzima koje stanice proizvode su unutarstanični, a njihovo iskorištavanje je ograničeno zbog visoke cijene izolacije neoštećena enzima iz stanice, jer se nalaze u relativno niskim koncentracijama unutar stanice. Navedeni problemi prevladavaju se upotrebom cijelih stanica kao izvora unutarstaničnih enzima, te se na taj način izbjegava dug i skup proces pročišćavanja, a enzim se čuva u svom prirodnom okruženju što smanjuje mogućnost njegove interakcije s neprirodnim okruženjem [14]. Većina enzima su rekombinantni oblici, geni odgovorni za proizvodnju enzima su preseljeni iz organizama npr. biljaka, životinja, do mikroba koji se lako koriste u industrijskoj proizvodnji. Sustavi koji se koriste za proizvodnju uključuju vlaknaste i nevlaknaste bakterije, kvasce, plijesni i transgenične biljke. Rekombinantni enzimi koriste se u industriji proizvodnje deterdženata, hrane, pića, tekstila, celuloze, papira, kozmetike, lijekova i bioenergije [15].

2.1.1. Struktura i svojstva

Mnogi enzimi sastoje se od proteinskog dijela i neproteinskog dijela, kofaktora [16]. Proteini su polimeri koji se sastoje od 51 do 34500 aminokiselinskih ostataka, od jednog do više lanaca. Primarna struktura proteina određena je genima, sekundarna struktura se sastoji od α -uzvojnice i β -naboranih listova, tercijarna struktura opisuje ukupnu trodimenzionalnu strukturu, a kvartarna struktura opisuje interakciju podjedinica multimernog proteina [17]. Proteini u enzimu obično su kuglasti, a veze zaslužne za sekundarne i tercijarne strukture proteina osjetljive su na promjene temperature i pH, što utječe na oblik odnosno katalitičku aktivnost enzima [18]. Za aktivnost mnogih enzima potreban je kofaktor. Kofaktori su ili metali (kationi, aktivatori koji se privremeno vežu na aktivno mjesto enzima, dajući intenzivno pozitivan naboj u proteinu enzima), ili male organske molekule zvane koenzimi. Organske skupine trajno vezane za enzim nazivaju se prostetičkim skupinama, a slabo vezani koenzimi se kao kosupstrati vežu za enzim, a zatim se nakon reakcije oslobađaju. Enzim bez svojeg kofaktora naziva se apoenzimom, a kompletan, katalitički aktivan holoenzimom. Zbog takve kompleksne strukture, enzimi su visoko specifični, po reakcijama koje kataliziraju i po izboru reaktanata (supstrata). Kod enzimskih reakcija sporedne reakcije su vrlo rijetke.

2.1.2. Enzimska kinetika

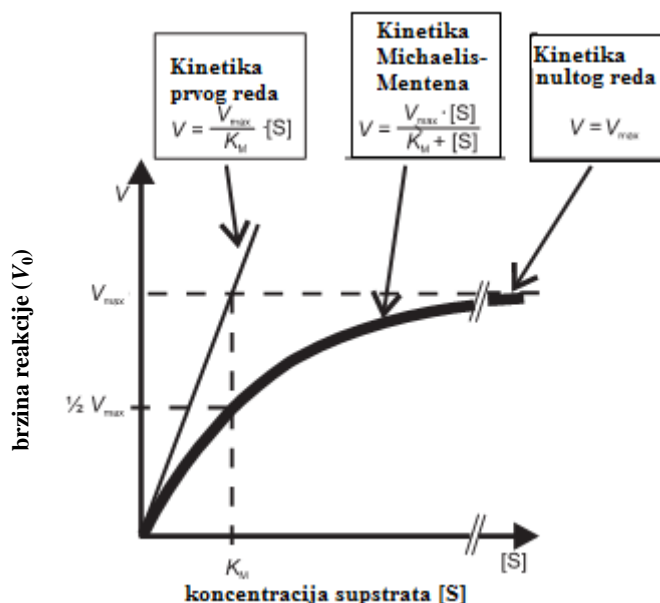
Godine 1913. Biokemičar Leonor Michaelis i biokemičarka Maud Menten predložili su jednostavan model koji objašnjava opažena kinetička svojstva enzima. Srž njihove zamisli je nastanak specifičnog kompleksa ES kao nezaobilaznog međustanja u katalizi. Predloženi model je najjednostavniji i objašnjava kinetička svojstva mnogih enzima:



Enzim E se veže sa supstratom S u kompleks ES, uz konstantu brzine k_1 . Kompleks ES ima dvije moguće sudbine, može disocirati na E i S uz konstantu brzine k_{-1} , ili može dati produkt P uz konstantu brzine k_2 , kompleks ES može i ponovno nastati iz E i P uz konstantu brzine k_{-2} . Ove reakcije mogu se pojednostaviti promatrajući samo brzinu na početku reakcije (v_0) kad je koncentracija produkta zanemariva, odnosno kad nema povratne reakcije i kada je ($k_{-2}[\text{P}] \approx 0$).



Kod enzima za koje vrijedi Michaelis-Menten kinetika, brzina reakcije povećanjem koncentracije supstrata asimptotski se približava maksimalnoj brzini (V_{\max}). Michaelisova konstanta (K_M) jednaka je koncentraciji supstrata kod koje se postiže polovica maksimalne brzine tj. brzina $V_{\max}/2$. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata kod enzima koji se ponaša prema kinetici tipa Michaelis-Menten prikazana je grafom, na slici 1. Prema tome, početna brzina (v_0) za svaku koncentraciju supstrata odredi se iz nagiba krivulje na početku reakcije, kada je povratna reakcija još zanemariva.



Slika 1. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata

U nastavku se nalazi izvod za jednadžbu Michaelis-Mentena:

Brzina raspada međuprodukta u biokatalizi jednaka je umnošku koncentracije kompleksa ES i konstante k_2 :

$$v_0 = k_2 \cdot [ES] \quad (3)$$

Brzina nastanka kompleksa:

$$ES = k_1 [E][S] \quad (4)$$

Brzina razgradnje kompleksa:

$$ES = (k_{-1} + k_2) [ES]. \quad (5)$$

Kad su brzine nastanka i razgradnje kompleksa $[ES]$ jednake, postiže se ustaljeno (stacionarno) stanje, u kojem koncentracije međuprodukata $[ES]$ ostaju nepromijenjene.

Izjednačavanjem jednadžbi, dobije se:

$$k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (6)$$

odnosno,

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (7)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (8)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (9)$$

Koncentracija slobodnog enzima približno je jednaka cjelokupnoj koncentraciji enzima umanjenoj za koncentraciju kompleksa ES:

$$[ES] = [E]_T - [ES] \quad (10)$$

pa proizlazi:

$$[ES] = \frac{([E]_T - [ES]) [S]}{K_M} \quad (11)$$

tj.

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{[S] + K_M}, \quad (12)$$

uvrštenjem tog izraza u jednadžbu (3) dobije se:

$$v_0 = k_2 \cdot [E]_T \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (13)$$

Maksimalna brzina postiže se kada su sva katalitička mjesta na enzimu zasićena supstratom, to jest kada je:

$$[ES] = [E]_T \quad (14)$$

$$V_{\max} = k_2 \cdot [E]_T, \quad (15)$$

uvrštavanjem u jednadžbu (13) nastaje jednadžba Michaelis-Menten:

$$v_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (16)$$

Vrijednosti K_M i V_{max} važne su karakteristike enzima. K_M je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj je popunjena polovica aktivnih mjesta, govori se o koncentraciji supstrata potrebnoj da se dostigne polovica maksimalne brzine reakcije. Maksimalna brzina, V_{max} , je jednaka broju molekula supstrata koji molekula enzima pretvori u produkt u jedinici vremena, kad je enzim potpuno zasićen supstratom. Kinetički model Michaelis-Menten značajno je pomogao razvoju enzimologije, zbog jednostavnosti i široke mogućnosti primjene. Ipak, taj model ne može opisati kinetička svojstva mnogih enzima, npr. alosteričkih enzima.

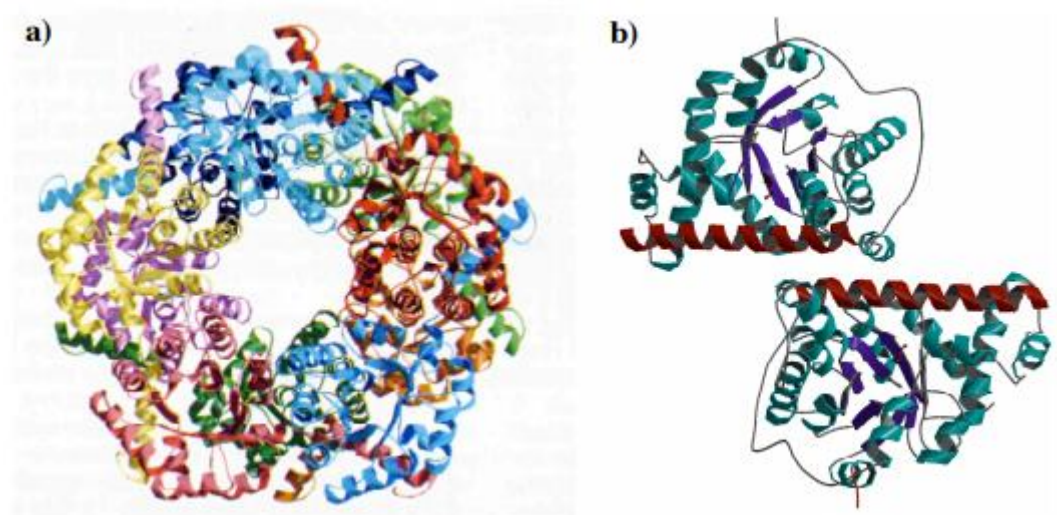
2.1.4. Aldolaze

U živim stanicama cijepanje i stvaranje C-C veza esencijalni su koraci u katabolizmu i anabolizmu raznih ugljikohidrata i nekih ketokiselina, pa u prirodi nalazimo razne enzime koji potpomažu stvaranje ili cijepanje C-C veza. Takvi enzimi privukli su pažnju sintetskih kemičara posljednjih nekoliko godina, a broj radova na temu sinteza složenih i rijetkih šećera i njihovih derivata raste. Do sada je poznato više od 30 aldolaza, a koliko je poznato, većina, ako ne i svi, organizmi sadrže aldolaze (EC 4.1.2.X) [10, 16]. Dakle, prisutne su u svim životinjskim i biljnim tkivima te u većini mikroorganizama. Postoje tri izoenzima aldolaza: Tip A nalazi se u mišićima i glavni je oblik enzima, tip B može se pronaći u jetri i bubrezima, a tip C uz poneki tip A nalazi se u mozgu. Još 1934. nađeno je da su aldolaze prisutne u mišićima i kvascu, a Neuberg i Kobel pretpostavili su iste godine, prisutnost aldolaze u bakteriji, što je kasnije potvrđeno kod *E.coli*. 1940. Herbert je prvi puta izolirao aldolazu od izomeraza iz mišića. 1950-ih i 1960-ih istraživao je reakcijski mehanizam te su aldolaze podijeljene u dvije klase. Istraživanje inhibitora počinje sredinom 1960-ih i početkom 1970-ih. Prva kristalna struktura visoke rezolucije aldolaze u kunića, zabilježena je 1997. Istraživanja u području inhibitora aldolaza, interakcija aldolaza s drugim staničnim proteinima i intermedijerima nastavljena su u svrhu boljeg razumijevanja važnosti u enzimskoj sintezi. Aldolaza je visoko specifičan enzim za supstrat, D-fruktoze. Tri izoenzima (A. B. C) koji se nalaze u sisavaca, sastoje se od 4 istovjetne podjedinice, svaki polipeptidni lanac sastoji se od 360 aminokiselina. Enzim ima homotetrametričku strukturu s podjedinicama, ako jedna od četiri podjedinica homotetramera nije aktivna cijeli je kompleks nesposoban za normalno funkcioniranje, što je posljedica tijesne povezanosti aktivnih mjesta. Inhibitori aldolaza jesu: teški metali (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{2+} , ...), derivati hidroksinaftaldehid fosfata, fosforilirani aromatski spojevi, D-Ertruloza-1-fostat, fosfatidilserin liposomi, fosfati i adenin nukleotidi. Aldolaze se primjenjuju u enzimskoj, organskoj sintezi, kvantifikaciji D-fruktoza-1,6-difosfata, određivanju metabolita u spojenim reakcijama [19]. Jedna od najvažnijih

reakcija organske sinteze je nastajanje C-C veze, takva reakcija je kompleksna te je teško postići stereoselektivnost, zbog toga se kod takvih reakcija koriste aldolaze jer su visokospecifične te mogu formirati C-C veze čak i sa supstratima koji su strukturno različiti od njihova prirodna supstrata. Aldolaze kataliziraju reverzibilno nastajanje C-C veze aldolnom adicijom nukleofilnog donora na elektrofilni aldehidni akceptor. Aldolaze mogu kontrolirati stereokemiju formiranih stereocentara bez obzira na strukturu i stereokemiju supstrata. Koriste se za sinteze kiralnih kompleksa, bioaktivnih spojeva poput aminokiselina, koristeći akiralne i jednostavne polazne materijale. Aldolaze mogu koristiti širok spektar aldehida kao akceptora, a donor je često strukturno nepromijenjiv. Prema vrsti donora dijelimo ih na: piruvat/2-oksobutirat aldolaze, dihidroxiaceton fosfat (DHAP) aldolaze, dihidroxiaceton (DHA) aldolaze, glicin/alanin aldolaze i acetaldehid aldolaze [4]. Također razlikujemo aldolaze klase I te aldolaze klase II, tzv. aldolazama klase I ne treba kofaktor, jer njihov reakcijski mehanizam aktivacije donora uključuje formiranje Shiffove baze na očuvanom lizinu u aktivnom mjestu enzima. Do nedavno se mislilo da se javljaju uglavnom kod viših eukariota, no u novijim istraživanjima pronađene su i u prokariotima. Aldolaze klase II ovise o metalnim ionima (uglavnom Zn^{2+} , i u nekim slučajevima Fe^{2+} te Co^{2+}) koji se ponašaju kao Lewisove kiseline i aktiviraju supstrat, donor. Mogu biti inhibirane s EDTA, često su stabilnije od aldolaza klase I što je važno pri sintezama, javljaju se samo u prokariotima i nižim eukariotima.

2.1.4.1. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza A129G

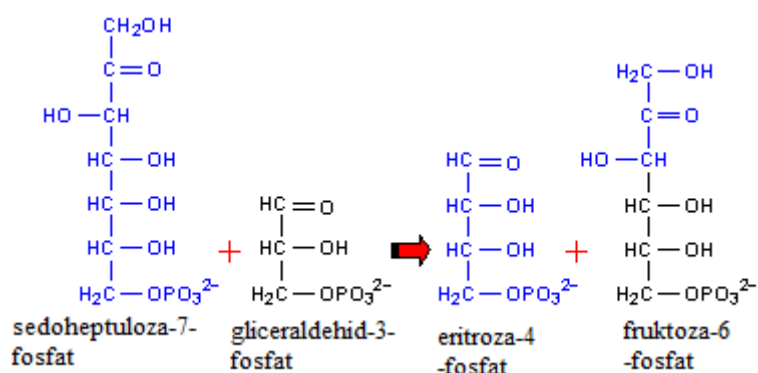
D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) je aldolaza klase I iz *E. coli*, koje kataliziraju adiciju DHA na D-gliceraldehid-3-fosfat. Prvi je spominju Schürman i Sprenger, pokazala se kao robustan i korisan katalizator raznolikih donora i akceptora. Jedna od glavnih prednosti FSA je što prihvaća nefosforilirani DHA kao donor umjesto skupog i nestabilnog DHAP [20]. Prvotno se mislilo da je FSA transaldolaza ili protein povezan sa transaldolazama, međutim FSA katalizira reakciju cijepanja ili formiranja fruktoza 6-fosfata [21]. Kao i FSA, transaldolaze (TAL) također pripadaju aldolazama klase I, osim toga strukturno su vrlo slične (Slika 2), dijele identitet sekvenci, a molekularna osnova specifičnosti različitih reakcija s transferazama u odnosu na reakciju s aldolazama do sada nije otkrivena [22].



Slika 2. Struktura a) FSA i b) TAL B iz *E. coli* [23]

2.1.4.2 Transaldolaze

Transaldolaza je enzim koji sudjeluje u putu pentoze fosfata, katalizirajući reakciju prikazanu na slici 3. Ovaj enzim, zajedno sa transketolazom, omogućuje vezu između glikolitičkih i pentoza fosfata puteva. Lizin je impliciran u katalitičkom mehanizmu enzima; djeluje kao nukleofil koji napada karbonilnu skupinu fruktoza-6-fosfata [24]. Transaldolaze su široko rasprostranjene u mikroorganizmima, biljkama i životinjama, izolirane su iz različitih vrsta stanica kvasaca, mliječne žlijezde goveda, te krumpira [25, 26]. Važnost ljudske trasaldolaze prepoznata je nedavno kako je uključena u različite autoimune bolesti i druge maligne bolesti, nedostatak transaldolaze uzrokuje cirozu jetre, akumulaciju metabolita iz puta pentoza fosfata u mokraći i krvi plazme, srčane probleme, itd. [27].



Slika 3. Reakcija katalizirana transaldolazom [28]

2.2. Biotransformacije

Kod enzimске katalize supstrat se najčešće transformira u produkt bez sporednih produkata, jer je biokatalizator strogo specifičan. Proces se najčešće odvija u jednom ili dva reakcijska stupnja te se dobije produkt strukturno sličan supstratu, a takvi procesi nazivaju se biotransformacijama [14]. Još od davnina, bez znanja da postoje, ljudi su koristili mikroorganizme za proizvodnju hrane i pića, Babilonci su proizvodili pivo, također se proizvodilo vino, a Egipćani su koristili kvasac kod pripreme kruha. Proizvodnja octa možda je najstariji i najpoznatiji primjer mikrobiološke oksidacije i vrlo je važna za razvoj u području biotransformacija živih stanica. Najvažniji izum koji je pridonio razvoju biotransformacija bio je mikroskop, koji je omogućio proćavanja mikroskopskog svijeta, a najstariji bioreaktor s imobiliziranim živim mikroorganizmima, tzv. generator, potjeće iz 1823. Razvoju biotransformacija pridonjeli su mnogi znanstvenici, neki od njih su: Pasteur, Brown, Buchner, Neuberg i Hirsch, Peterson, Watson i Crick, Beadle i Tatum i drugi. Nakon otkrića Watsona i Cricka u području strukture i sastava RNA i DNA, te otkrića Beadlea i Tatuma u području genetskog materijala bakterije, Cohen i Boyer otkrili su tehnologiju rekombinantne DNA, koja se ubrzo počela i primjenjivati [29].

2.2.1. Reakcije prve faze biotransformacije

U reakcije prve faze biotransformacija ubrajamo: Reakcije oksidacije - hidroksiliranje, dealkiliranje, stvaranje oksida, desulfuriranje, dehalogeniranje, oksidacija alkohola, oksidacija aldehida, deaminiranje. Zatim, reakcije redukcije - redukcija aldehida, azoredukcija, nitroredukcija, te reakcije hidrolize: hidrolize estera i hidrolize amida. Oksidoredukcijski procesi u biološkim sustavima odvijaju se posredovanjem posebne skupine koenzima koji mogu biti piridinski i flavinski nukleotidi. Reducirani oblici tih koenzima, odnosno prostetičkih skupina, prenose svoje elektrone s visokim potencijalom prijelaza na molekulu kisika kao krajnjeg akceptora, nakon čega opet poprimaju oksidirani oblik sposoban za sudjelovanje u novom slijedu oksidoredukcijskih procesa. Među najčešće oksidoredukcijske reakcije u organizmu ubraja se oksidacija alkoholne skupine u karbonilnu ili, suprotno, redukcija karbonilne skupine u alkoholnu. Te su reakcije katalizirane enzimima, za čije je djelovanje prijeko potrebna prisutnost kosupstrata – donora, odnosno akceptora vodikovih iona i elektrona. Hidrolitička razgradnja ksenobiotika i endogenih tvari važan je biotransformacijski proces koji najčešće dovodi do smanjenja biološke aktivnosti, ali može i slabije djelatne (ili nedjelatne) oblike lijekova prevesti u djelatne. Velik broj lijekova tipa

estera i amida biotransformira se enzimskom i neenzimskom hidrolizom. Enzimi koji kataliziraju cijepanje kemijske veze uz sudjelovanje molekula vode zovu se hidrolaze.

2.2.2. Reakcije druge faze biotransformacije

Reakcije druge faze biotransformacije uključuju: konjugaciju glukuronida, aciliranje, metiliranje/demetiliranje, stvaranje merkapturinskih kiselina i sulfokonjugaciju. Konjugacija s glukuronskom kiselinom karakteristična je za tvari koje u strukturi sadrže hidroksilne, amino i karboksilne skupine. Biosinteza sulfokonjugata u *in vivo* i *in vitro* uvjetima odvija se uz sudjelovanje enzima sulfotransferaze, koja katalizira prijenos sulfatne skupine na hidroksi- i amino- skupine supstrata. Acetiliranje amino-skupine je čest konjugacijski proces. Biološko acetiliranje glavni je metabolički proces inaktivacije mnogih ksenobiotika koji sadrže Ar-NH₂ ili -NHNH₂ skupinu. Metiliranje je karakteristično za spojeve s: -OH, -NMR i -SH skupinom, a važno je za metabolizam endogenih tvari (kateholamina) [30].

2.3 Aldolne reakcije (Adicija - dehidratacija)

Aldolna reakcija je dimerizacija, što znači da se dvije molekule aldehida vežu u jednu molekulu produkta. Ispitivanje strukture produkta ukazuje da je jedan α - ugljikov atom jedne molekule reaktanta stvorio vezu prema karbonilnom ugljikovom atomu drugoga. Prihvaćeni mehanizam za reakciju obuhvaća adiciju enolatnog aniona jedne molekule na karbonilnu skupinu druge. Kada međusobno reagiraju dva različita karbonilna spoja, mogu nastati ukrštene aldolne reakcije. Grijanjem s kiselinom ili bazom prevode se β -hidroksi karbonilni spojevi, koji se dobivaju aldolnom reakcijom, u α,β -nezasićene karbonilne spojeve. Gubitak vode, eliminacijsku reakciju potpomaže nastajanje stabilnijeg konjugiranog sustava. Aldolna reakcija je jedan od važnih sintetičkih postupaka koji se koriste kod karbonilnih spojeva. Ta se reakcija mnogo primjenjuje i u industriji, a enzimom katalizirane aldolne reakcije imaju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima. Korisnost aldolne reakcije za sintezu sastoji se u stvaranju novih veza ugljik-ugljik tj. izgradnji ugljikovog kostura. Procesi takva tipa, važni za sintezu, često se nazivaju konstrukcijskim reakcijama. Aldolnim postupkom nastaje spoj s funkcionalnim grupama koje se mogu koristiti za dalje pretvorbe [9]. Napredak kemijske sinteze je izuzetno brz, novi spojevi sintetiziraju se svaki dan i više nije pitanje što možemo sintetizirati, već kako ćemo to sintetizirati [31]. Reakcija aldolne adicije jedna je od najmoćnijih metoda formiranja C-C veza. Biokatalitička metoda provedbe daleko je poželjnija od metoda koje ne uključuju enzime, a iako postoje različiti načini katalize, postupak

$$\text{Cbz-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CHO} + \text{HOCH}_2\text{C(=O)CH}_2\text{OH} \xrightleftharpoons[\text{aldolase}]{\text{D-fructose-6-phosphate}} \text{Cbz-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH(OH)CH(OH)C(=O)CH}_2\text{OH}$$

N-Cbz-3-aminopropanal dihidroksiacetone aldol



Slika 5. Kemijska struktura D-fagomina [34]

Prostor u kojem se odvija bioproces može se gledati kao reaktor, odnosno bioreaktor obzirom da je proces kataliziran biološkim katalizatorom. Enzimski kataliziran bioproces u bioreaktoru analogan je kemijski kataliziranom procesu u kemijskom reaktoru, s tim da je enzimski katalizirani bioproces strogo selektivan i daje jedan produkt, pa ga je industrijski jednostavnije provesti [14]. Kemijski reaktor je uređaj u kojem se odvija i provodi kemijska reakcija s ciljem dobivanja određenog korisnog produkta, čini osnovu u dimenzioniranju i projektiranju određenog kemijskog procesa te na neki način predstavlja "srce" svakog tehnološkog procesa.

2.4.1. Kotlasti (šaržni) reaktor

Kotlasti reaktor (Slika 6) se često koristi u industriji za provođenje velikog broja reakcija, pretežno u kapljevitoj fazi. Konstruktivno je izveden najčešće u obliku zatvorenog kotla s miješalicom, sadrži otvore kroz koje se reakcijska smjesa unosi i iznosi, te plašt za izmjenu topline, zagrijavanje ili hlađenje. Ovisno o vrsti reakcije, kontroli, vođenju, regulaciji, izmjeni topline te sigurnosti na radu sadrži i mnogo drugih potrebnih elemenata. Pogodan je za istraživanje kinetike u kapljevitoj fazi. Vrijeme kao nezavisna varijabla može se mjeriti s vrlo velikom točnošću, dok je mjerenje koncentracije ograničeno točnošću analitičkih metoda. Iz jednog provedenog eksperimenta može se dobiti mnogo mjernih točaka, mjerenjem koncentracija u različitim vremenima trajanja reakcije. Ovaj tip reaktora nije pogodan za istraživanje kinetike u plinskoj fazi, reakcija pri visokim tlakovima i temperaturama, te složenih reakcija kod kojih nastaje niz međuprodukata.



Slika 6. Kotlasti reaktor

2.4.2 Cijevni reaktor

Cijevni reaktori (Slika 7), cilindrične cijevi ispunjene česticama katalizatora ili prazne, mogu raditi pri niskim konverzijama kao diferencijalni reaktori ili pri visokim konverzijama kao integralni reaktori. Zbog svoje jednostavne konstrukcije pogodni su za proizvodnju s velikim kapacitetima pa se uglavnom koriste u velikoj anorganskoj, petrokemijskoj, i drugim industrijama organske sinteze. U industrijskoj primjeni radi pretežno u stacionarnom stanju, vremenski vrlo dugo, rad se prekida samo prilikom godišnjeg pregleda ili izmjene katalizatora. Stalnost njihovog rada omogućuje ujednačenu kvalitetu produkata, koriste se za provedbu reakcija u homogenim i heterogenim sustavima. Osnovni zahtjev koji se postavlja pred eksperimentalni cijevni reaktor je što bolje približenje idealnom strujanju i izotermnom načinu rada. Pogodan je za istraživanje kinetike u plinskoj i kapljevitoj (ako viskozitet nije prevelik) fazi pri višim tlakovima i temperaturama, koristi se mnogo više za istraživanje

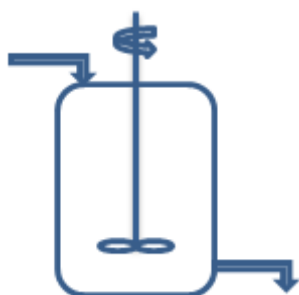
kinetike u heterogenim sustavima. Jedan kinetički eksperiment daje samo jednu mjernu točku ako se određuje koncentracija na izlazu iz reaktora.



Slika 7. Cijevni reaktor

2.4.3. Protočno kotlasti reaktor

Protočno kotlasti reaktor (Slika 8) je sličan kotlastom reaktoru, posjeduje uređaj za miješanje, osim toga potrebno je i na neki način osigurati odvod i dovod topline reaktoru, npr. pomoću izmijenjivača topline. Protočno kotlasti reaktori u stacionarnom i nestacionarnom radu često se koriste u industriji, pojedinačno i kao niz slijedno ili paralelno povezanih reaktora. Nisu pogodni za rad kod viših tlakova, te se uglavnom koriste za provođenje reakcija u kapljevitom sustavu, ali i za heterogene sustave. Pogodni su za reakcije kod kojih su male konverzije i za provođenje složenih reakcija. U protočno kotlastom reaktoru smjesa je dobro miješana, sastav je homogen, bilance množine tvari i topline mogu se postaviti za čitavi volumen reaktora, radi u stacionarnom stanju, izotermno, bez promjene gustoće reakcijske smjese tj. sa stalnim volumenom reakcijske smjese. Također, protočno kotlasti reaktor vrlo je dobar izbor kao eksperimentalni reaktor u kinetičkim istraživanjima homogenih i heterogenih sustava, jer je moguće postići stacionarnost, izoternost rada te idealno miješanje, ali nedostak je složenija izvedba u usporedbi s cijevnim i kotlastim reaktorom [35, 36].

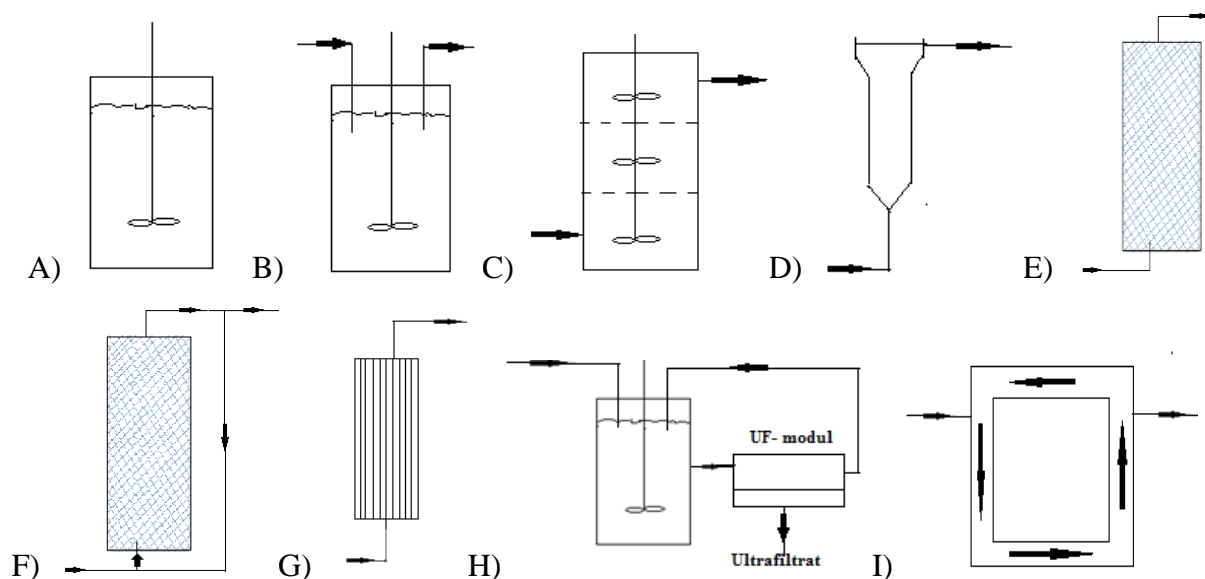


Slika 8. Protočno kotlasti reaktor

2.4.4 Bioreaktori za biokatalitičke procese

Posude u kojima se događaju biokemijske reakcije katalizirane slobodnim, imobiliziranim enzimima ili stanicama vezanim na nosaču, uz točno određene, nadzirane i regulirane uvjete nazivaju se bioreaktorima za biokatalitičke procese. Takvi bioreaktori osiguravaju bržu i

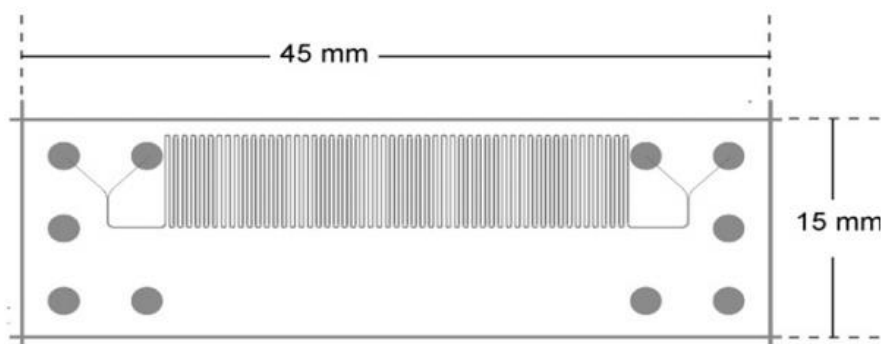
potpuniju pretvorbu reaktanata u specifičan proizvod, a obzirom na način rada te protjecanja reakcijskog medija dijele se na: homogene i heterogene, punidbene i kontinuirane, otvorene i zatvorene, s mehaničkim mješalom i s čepolikim strujanjem. Sheme različitih bioreaktora nalaze se na slici 9. Punidbeni bioreaktor s mješalom koristi se za rad s topljivim enzimima. U bioreaktoru s mješalom za kontinuirani rad lako je održavati i nadzirati reakcijske uvjete kao što su pH, temperatura, koncentracija biokatalizatora, pa je pogodan za biokonverzije s otopljenim ili suspendiranim biokatalizatorima. U bioreaktoru s lebdećim slojem, čestice biokatalizatora nalaze se u lebdećem stanju, bioreaktori s nasutim slojem i cijevni bioreaktori s čepolikim protokom reakcijske smjese učinkovitiji su od bioreaktora s mehaničkim mješalom, jednostavni su i pogodni za automatsko kontinuirano vođenje procesa. Kod cijevnih bioreaktora utrošak energije za rad je nizak, ali teško je održavati procesne parametre stalnima. Cijevni bioreaktor s povratnim tokom u obliku petlje uspješno se primjenjuje za hidrolizu viskoznih otopina škroba, a ultrafiltracijski bioreaktorski sustavi pogodni su za provođenje depolimerizacijskih reakcija [8].



Slika 9. A) Punidbeni bioreaktor s mješalom B) Kontinuirani s mješalom C) Višestupanjski sustav miješanja D) s lebdećim slojem E) s nasutim slojem F) s nasutim slojem i i reciklacijom G) cijevni H) s mješalom i ultrafiltrom I) cijevni s kružnom reciklacijom

2.4.5 Mikroreaktori

Posljednjih nekoliko godina razvijaju se mikroreaktori (Slika 10), umanjeni sustavi za provedbu kemijskih reakcija proizvedeni suvremenom mikrotehnologijom i preciznim inženjerstvom. Svojim dimenzijama i izvedbom omogućavaju približavanje stvarnih procesnih uvjeta idealnim. Čini ih mreža mikrokanala urezanih u čvrstu pločicu. Mali promjer mikrokanala osigurava uglavnom laminarno strujanje kapljevine u sustavu što olakšava postavljanje modela i kontrolu procesa. U mikroreaktorima postiže se učinkovitiji prijenos tvari i topline, zahtijevaju se manje količine reaktanata i katalizatora, pa su pogodni za opasnije reakcije koje su eksplozivne ili zahtijevaju upotrebu otrovnih tvari. Kako bi ih se uvećalo, čak do nekoliko tisuća jedinica povezuje se u serijski ili paralelan spoj. Praktični su jer omogućavaju provedbu nekoliko istovremenih reakcija, separacija i analiza cjelokupnog procesa, u jednom kanalu ili u nekoliko njih, a ukoliko jedna jedinica prestane raditi ne dolazi do zastoja u provođenju ostalih procesnih stupnjeva. S obzirom na različite tipove reakcija kojima su namijenjeni razlikujemo: mikromiksere, mikroizmjenjivače topline, mikroseparatore, mikroreaktore za provedbu reakcija u plinskoj fazi, mikroreaktore za provedbu reakcija u kapljevitoj fazi i višefunkcionalne mikroreaktore za provedbu reakcija s fluidima bez obzira na njihovo agregatno stanje. Prema vrsti reakcije koja se provodi razlikujemo mikroreaktore u kojima se provode kemijske reakcije i mikroreaktore u kojima se odvijaju biokemijski procesi. Proces u mikroreaktorima najčešće se provode kontinuirano, ali koriste se i mikroreaktori sa šaržnim principom rada. Neki od nedostataka mikroreaktora su nemogućnost primjene kao zamjena za reaktore laboratorijske i industrijske veličine te nisu pogodni za viskozne kapljevine i smjese sa većom koncentracijom čvrstih čestica zbog mogućnosti začepljenja [37].



Slika 10. Shematski prikaz mikroreaktora s uvidom u njegovu unutarnju građu

3. MATEMATIČKO MODELIRANJE

3.1. Matematički model

Kao što je već rečeno, skup matematičkih objekata koji apstraktno reproduciraju učinke neke uzročno-posljedične veze smatraju se njenim matematičkim modelom. Matematički model služi za optimizaciju procesa i iznalaženje optimalnih rješenja. Modeliranje procesa i sustava podrazumijeva izradu matematičkih modela, koji u odgovarajućem stupnju točnosti opisuju proces ili sustav s ciljem simulacije varijantnih rješenja, analize i prognoziranja stanja procesa još u fazi projektiranja. [12, 13]. Modeli se sastoje od varijabli, koeficijenata i matematičkih operatora. Varijable u modelu predstavljaju neka svojstva sustava, a u modelu mogu postojati različiti tipovi varijabli: ulazne i izlazne, zavisne i nezavisne, varijable stanja i slučajne varijable. Što je više veza među varijablama poznato, model je točniji. Stoga je nekada korisno u model ugraditi selektivne informacije na temelju intuicije, iskustva, stručnog mišljenja ili uvjerljivosti matematičkog izraza. Matematičko modeliranje je općenito prepoznatljivo kao proces primjene matematike na realni sustav radi mogućnosti spoznaja kasnije potrebnih informacija. Postoje četiri vrlo česta pristupa matematičkom modeliranju: empirijsko, simulacijsko, determinističko te stohastičko modeliranje. Empirijsko modeliranje uključuje ispitivanje podataka vezanih za problem konstruiranjem matematičkih ovisnosti između varijabli pomoću raspoloživih podataka, simulacijsko modeliranje podrazumijeva uporabu računalnih programa za stvaranje scenarija utemeljenog na skupu pravila koja određuju kako će se proces razvijati. Determinističko modeliranje podrazumijeva uporabu jednadžbe ili skupa jednadžbi za modeliranje ili predviđanje izlaznih vrijednosti iz događaja ili sustava, a stohastičko modeliranje ide korak dalje od determinističkog i pri kreiranju matematičkih jednadžbi uzima u obzir i slučajnost i vjerojatnost da će se neki događaj ostvariti [38].

3.2 Scientist

Programski paket korišten u ovom radu je Scientist. Scientist je osmišljen kao odgovor na problem uklanjanja eksperimentalnih podataka u računalni program, uključuje mogućnost rješavanja sustava jednadžbi, nelinearnih, običnih diferencijalnih i Laplaceove transformacije. Scientist je aplikacija za istraživače koji znaju što se događa s njihovim podacima i trebaju uspostaviti temeljne vrijednosti parametara za modeliranje pojava u stvarnom svijetu. Nudi izuzetno jednostavan unos modela, upravljanje podacima, kontrolu početnih parametara procjene i ograničenja vrijednosti parametara, te potpunu statističku analizu i kvalitetan grafički prikaz. Modeli se mogu sastojati od jedne funkcije, više funkcija koje se mogu

primijeniti istodobno, implicitnih jednadžbi, parametarskih jednadžbi, diferencijalnih ili integralnih jednadžbi i jednadžbi koje uključuju Laplaceove transformacije. Scientist može modelirati pojave iz svih znanstvenih i tehničkih disciplina, tako da se koristi u mnogim nastavnim i istraživačkim programima, uključujući: fizikalnu kemiju, organsku kemiju, farmaceutiku, biofiziku, termodinamiku i prijenos topline, kinetiku, genetiku, sociologiju, ekonomiju, fiziku, strojarstvo, elektrotehniku, građevinarstvo, primijenjenu matematiku i druge [39]. Između predloženih modela bolje je koristiti jednostavniji model s manje parametara, ako je točnost procjene podjednaka te ako to dozvoljava fizička slika o reakcijskom putu [40]. Jednostavnost matematičkog modela postiže se jednostavnom fizikalnom predodžbom reaktorskog sustava, pretpostavi se idealizirano stanje i procesi u reaktoru, jer se lakše matematički formuliraju.

3.3 Kinetički model kemijske reakcije

Kinetički model kemijske reakcije je matematički izraz koji opisuje vezu između brzine kemijske reakcije i reakcijskih veličina stanja i parametara, kinetički modeli potrebni su za optimiranje procesnih uvjeta, za procjenu volumena reaktora, procjenu konverzije u reaktoru, simulaciju procesa, procjenu procesnih varijabli i parametara [41]. Osnovni kinetički model kojim se opisuje brzina enzimski kataliziranih reakcija je jednadžba Michaelis – Menten (16), поближе opisana ranije (2.1.2.).

3.4. Kinetički model aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-3-aminopropanal

Matematički model aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-3-aminopropanal sastoji se od kinetičke jednadžbe i jednadžbe bilance tvari svakog sudionika reakcije, u reaktoru. Brzina reakcije aldolne adicije uz D-fruktoza-6-fosfat aldolazu A129G može se opisati jednadžbom (17), a brzina reverzne reakcije jednadžbom (18)

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{N-Cbz-3-aminopropanal} \cdot c_{DHA} \cdot Y_{FSA}}{\left(K_m^{N-Cbz-3-aminopropanal} + c_{N-Cbz-3-aminopropanal} \right) \cdot (K_m^{DHA} + c_{DHA})} \quad (17)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_{aldol} \cdot Y_{FSA}}{K_m^{aldol} \cdot \left(1 + \frac{c_{N-Cbz-3-aminopropanal}}{K_i^{N-Cbz-3-aminopropanal}} \right) + c_{aldol}} \quad (18)$$

Jednadžbe (19), (20) i (21) jesu jednadžbe bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-aminopropanal}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (19)$$

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (20)$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (21)$$

Jednadžbe (22) - (24) su jednadžbe bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru izražene po vremenu zadržavanja

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-aminopropanal}}{d\tau} = -r_1 + r_2 \quad (22)$$

$$\frac{dc_{DHA}}{d\tau} = -r_1 + r_2 \quad (23)$$

$$\frac{dc_{aldol}}{d\tau} = r_1 - r_2 \quad (24)$$

Jednadžbe (25) - (27) jesu jednadžbe bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru izražene po volumenu

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-aminopropanal}}{dV} = (-r_1 + r_2) \cdot v_0 \quad (25)$$

$$\frac{dc_{DHA}}{dV} = (-r_1 + r_2) \cdot v_0 \quad (26)$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dV} = (r_1 - r_2) \cdot v_0 \quad (27)$$

Jednadžbe (28) – (30) su jednadžbe bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru izražene po duljini reaktora

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-aminopropanal}}{dl} = \frac{-r_1 + r_2}{u} \quad (28)$$

$$\frac{dc_{\text{DHA}}}{dl} = \frac{-r_1 + r_2}{u} \quad (29)$$

$$\frac{dc_{\text{aldol}}}{dl} = \frac{r_1 - r_2}{u} \quad (30)$$

Jednadžbe (31) – (33) su jednadžbe bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru

$$\frac{dc_{N\text{-Cbz-3-aminopropanal}}}{dt} = \frac{c_{N\text{-Cbz-3-aminopropanal},0} - c_{N\text{-Cbz-3-aminopropanal}}}{\tau} - r_1 + r_2 \quad (19)$$

$$\frac{dc_{\text{DHA}}}{dt} = \frac{c_{\text{DHA},0} - c_{\text{DHA}}}{\tau} - r_1 + r_2 \quad (20)$$

$$\frac{dc_{\text{aldol}}}{dt} = \frac{c_{\text{aldol},0} - c_{\text{aldol}}}{\tau} + r_1 - r_2 \quad (21)$$

3.4.1. Stabilnost enzima aldolaze

Stabilnost enzima aldolaze prikazana je jednadžbom (31)

$$\frac{dV_{m3}}{dt} = -k_d \cdot V_{m3} \quad (31)$$

4. REZULTATI

U ovom radu ispitivana je reakcija aldolne adicije katalizirana D-fruktoza-6-fosfat aldolazom A129G u kotlastom, protočno kotlastom i cijevnom reaktoru, prednosti i nedostaci odvijanja reakcije u različitim reaktorima pomoću programskog paketa Scientist. Kinetički parametri potrebni za modeliranje reakcije preuzeti su iz literature. Rezultati su prikazani na Slikama 11-15 i Tablicama 2-6 .

4.1 Kinetički parametri

U tablici 1. Nalaze se parametri korišteni u reakciji aldolne adicije, preuzeti iz literature

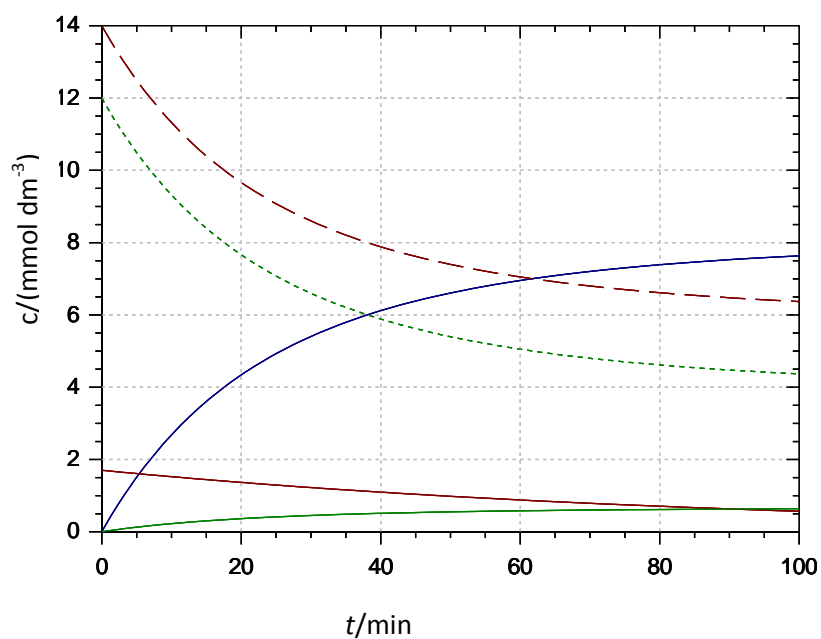
Tablica 1. Kinetički parametri za reakciju aldolne adicije DHA na N-Cbz-3-aminopropanal, katalizirane s FSA A129G u kotlastom reaktoru

Parameter	Mjerna jedinica	Vrijednost
V_{m1}	U mg^{-1}	2.86 ± 0.19
K_m^{DHA}	mmol dm^{-3}	50.12 ± 7.51
$K_m^{\text{N-Cbz-3-aminopropanal}}$	mmol dm^{-3}	24.34 ± 4.28
V_{m2}	U mg^{-1}	18.199 ± 1.882
K_m^{aldol}	mmol dm^{-3}	188.95 ± 61.61
$K_i^{\text{N-Cbz-3-aminopropanal}}$	mmol dm^{-3}	0.28 ± 0.09

4.2 Kotlasti reaktor

Tablica 2. Vrijednosti koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G te konverzije dobivene u Scientistu pomoću matematičkog modela za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru, uz nestabilan enzim ($k_d = 0,011 \text{ min}^{-1}$)

$c(\text{N-Cbz-3-aminopropanal})/$ (mmol dm ⁻³)	$c(\text{DHA})/$ (mmol dm ⁻³)	γ (FSA)/ (mg mL ⁻¹)	X (100 min)
14	12	1,7	0.636

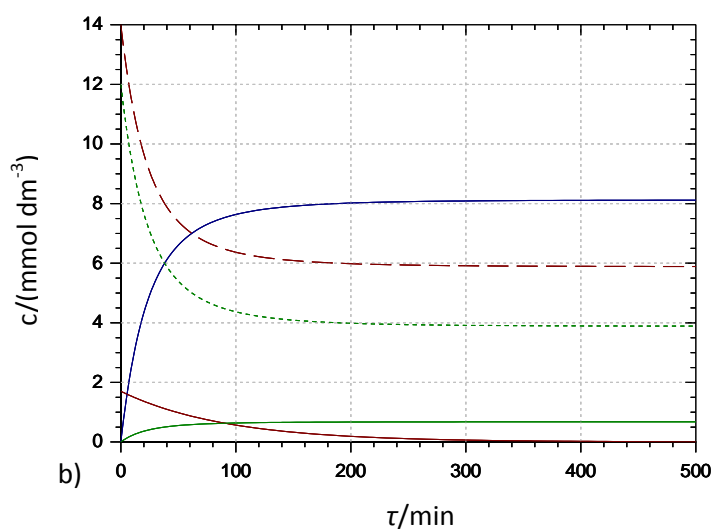
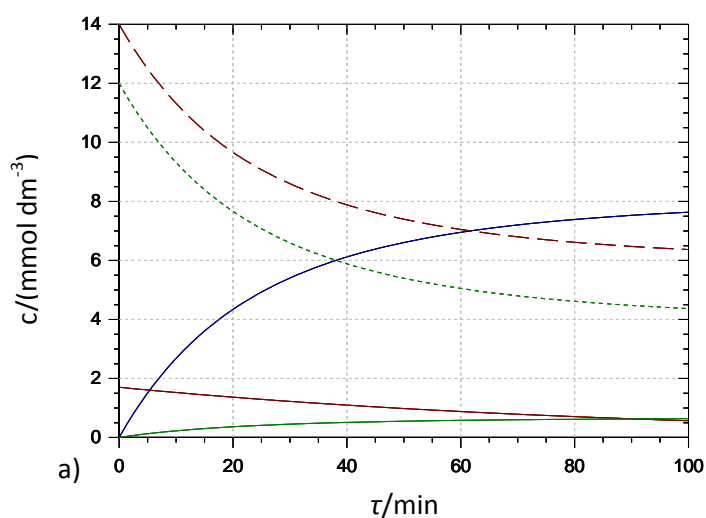


Slika 11. Grafički prikaz simulacije za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru, uz nestabilan enzim ($k_d = 0,011 \text{ min}^{-1}$)

4.3 Cijevni reaktor

Tablica 3. Vrijednosti koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G, te konverzije dobivene u Scientistu pomoću matematičkog modela za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru pri vremenu zadržavanja 100 min i 500 min, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$)

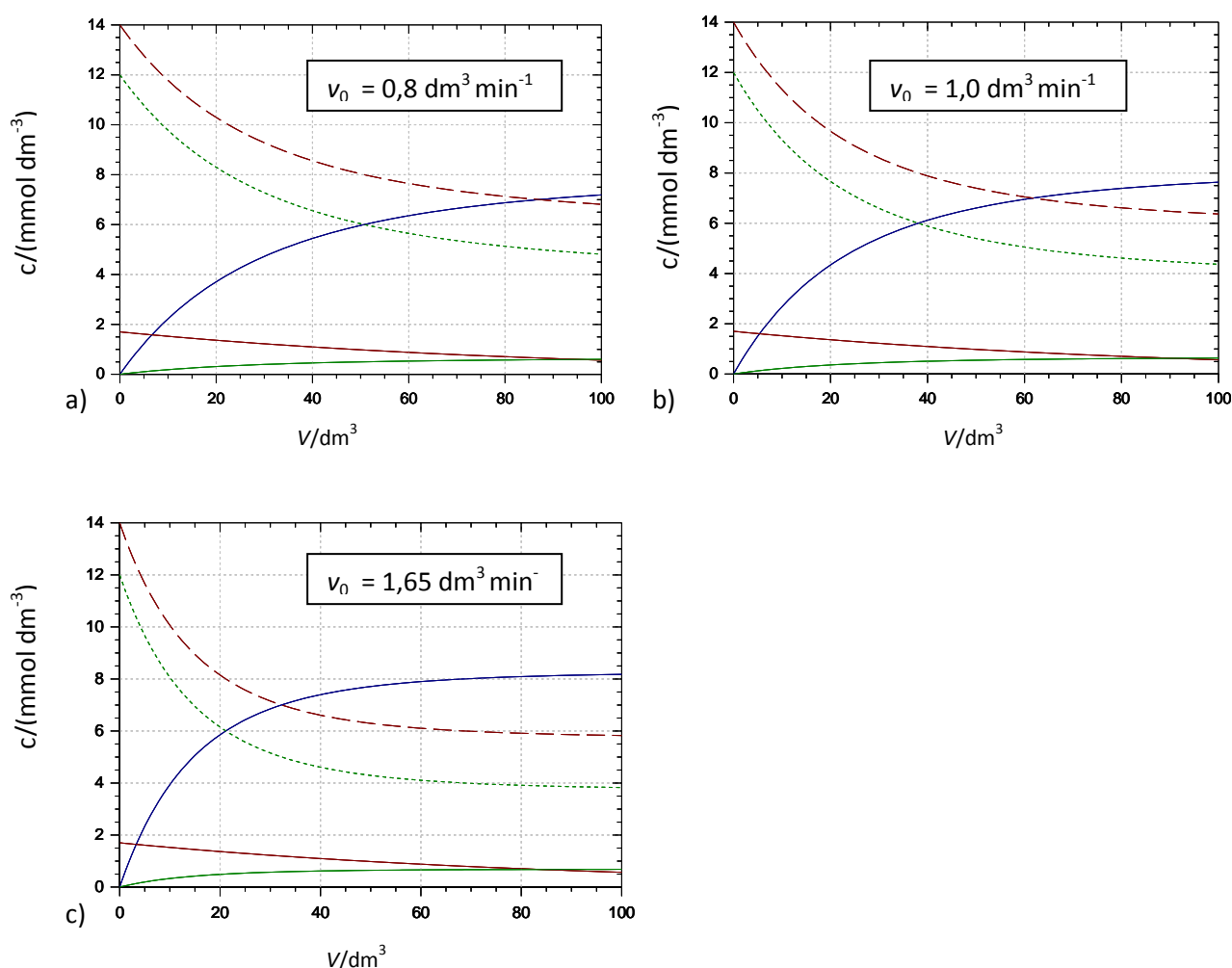
$c(\text{N-Cbz-3-aminopropanal})$ /(mmol dm ⁻³)	$c(\text{DHA})$ /(mmol dm ⁻³)	$\gamma(\text{FSA})/$ (mg mL ⁻¹)	X ($\tau=100$ min)	X ($\tau=500$ min)
14	12	1,7	0,636	0,676



Slika 12. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru, promjena koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G, te konverzije, promjenom vremena zadržavanja, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$), pri maksimalnim vrijednostima vremena zadržavanja 100 min i 500 min

Tablica 4. Vrijednosti koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G te konverzije dobivene u Scientistu pomoću matematičkog modela za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru s promjenom volumena reaktora, uz različite vrijednosti protoka te uz nestabilan enzim, ($k_d=0,011\text{ min}^{-1}$)

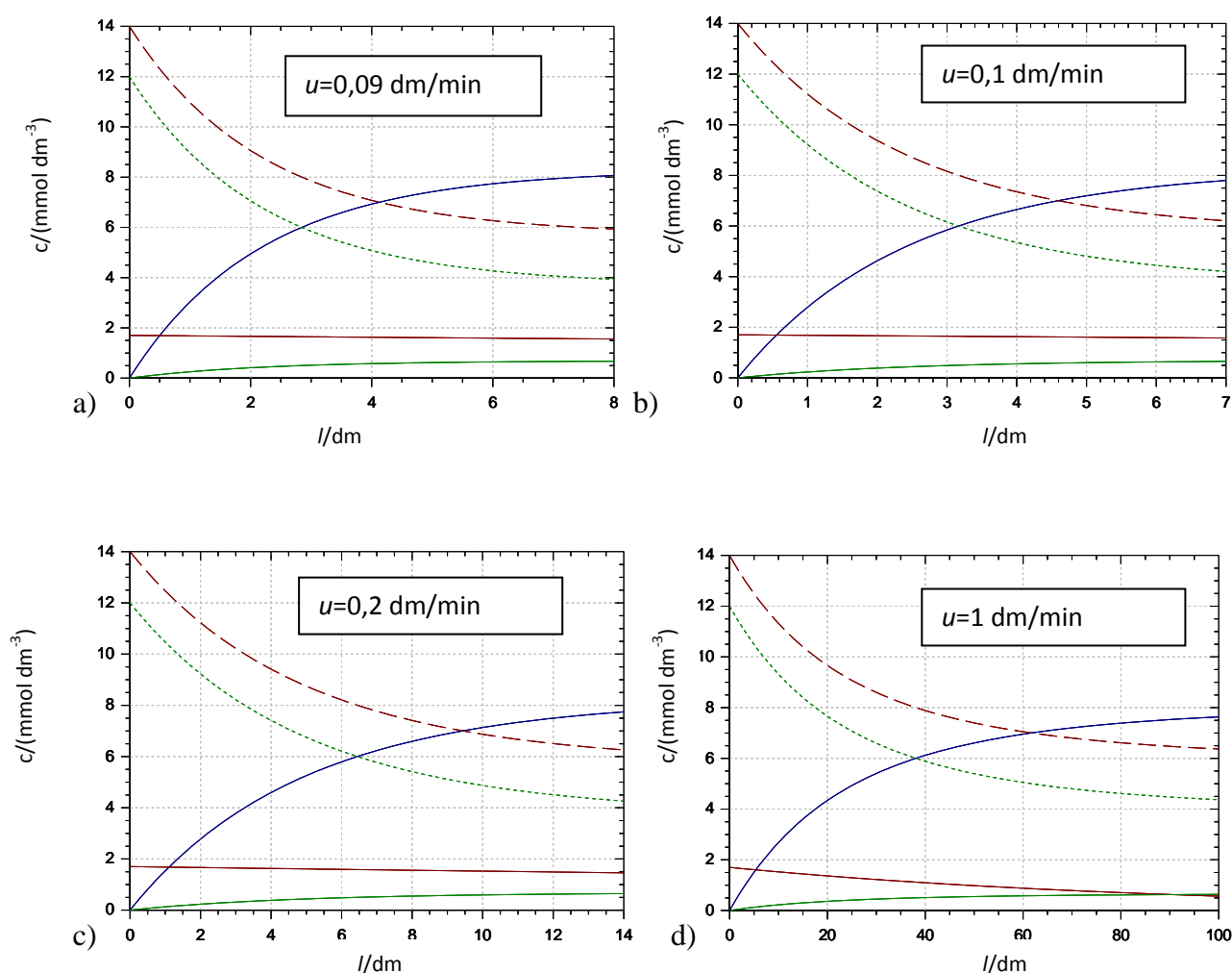
$c(\text{N-Cbz-3-aminopropanal})/$ (mmol dm ⁻³)	$c(\text{DHA})/$ (mmol dm ⁻³)	γ (FSA)/ (mg mL ⁻¹)	$v_0/$ (dm ³ /min)	X ($V=100$ dm ³)	$\tau/$ min
14	12	1,7	0,8	0,599	125
14	12	1,7	1	0,636	100
14	12	1,7	1,65	0,681	60,6



Slika 13. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru, promjena koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G, te konverzije, promjenom volumena, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{ min}^{-1}$), pri maksimalnoj vrijednosti volumena 100 dm³, pri različitim vrijednostima protoka, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{ min}^{-1}$)

Tablica 5. Vrijednosti koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G te konverzije dobivene u Scientistu pomoću matematičkog modela za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru s promjenom duljine reaktora, uz različite vrijednosti linearne brzine, te uz nestabilan enzim, ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$)

$c(\text{N-Cbz-3-aminopropanal})/$ (mmol dm ⁻³)	$c(\text{DHA})/$ (mmol dm ⁻³)	γ (FSA)/ (mg mL ⁻¹)	$u/$ (dm/min)	X	l/dm
14	12	1,7	0,09	0,635	5,6
14	12	1,7	0,1	0,637	6,3
14	12	1,7	0,2	0,632	12,6
14	12	1,7	1	0,636	100

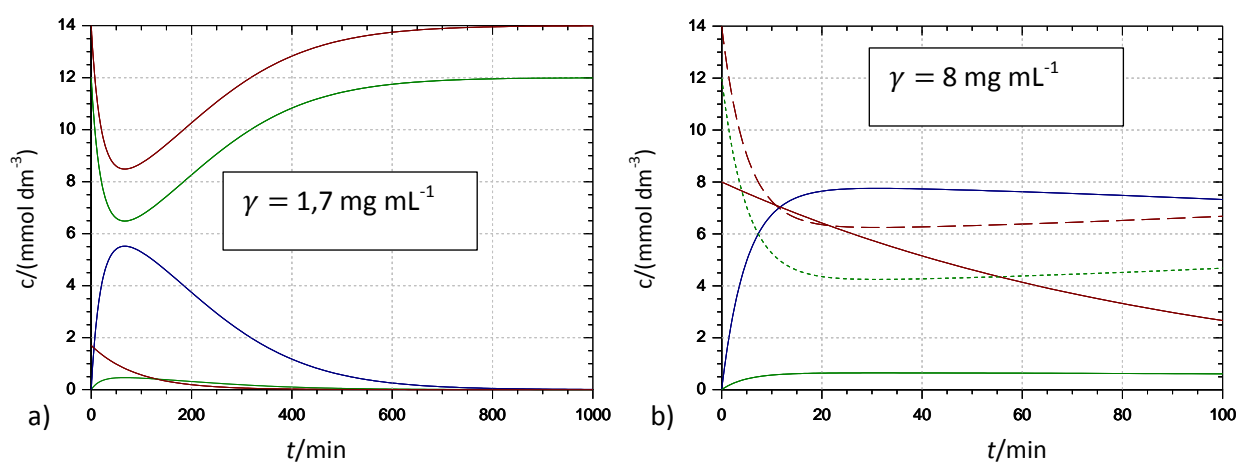


Slika 14. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u cijevnom reaktoru, promjena koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G, te konverzije, promjenom duljine reaktora, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$), pri različitim linearnim brzinama, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$)

4.4 Protočno kotlasti reaktor

Tablica 6. Vrijednosti koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G, te konverzije dobivene u Scientistu pomoću matematičkog modela za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru, uz vrijeme zadržavanja 100 min, te uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$)

$c(\text{N-Cbz-3-aminopropanal})/$ (mmol dm ⁻³)	$c(\text{DHA})/$ (mmol dm ⁻³)	γ (FSA)/ (mg mL ⁻¹)	τ/min	X	t/min
14	12	1,7	100	0,001	1000
14	12	1,7	100	0,441	100
14	12	8	100	0,637	20



Slika 15. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru, promjena koncentracija *N*-Cbz-3-aminopropanala, dihidroksiacetona, enzima FSA A129G, te konverzije, s vremenom, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$), pri različitim koncentracijama enzima, uz nestabilan enzim ($k_d=0,011\text{min}^{-1}$)

5. RASPRAVA

Za svaku od simulacija korištene su sljedeće koncentracije: Koncentracija dihidroksiacetona (DHA) iznosi 12 mmol dm^{-3} , *N*-Cbz-3-aminopropanala 14 mmol dm^{-3} , koncentracija enzima je $1,7 \text{ mg mL}^{-1}$. Pretpostavljeno je da je enzim nestabilan, a konstanta deaktivacije enzima iznosi $0,011\text{min}^{-1}$.

5.1. Kotlasti reaktor

U kotlastom reaktoru (Slika 11) za 100 minuta postignuta je konverzija 63,6% (Tablica 2). Što je vrijeme provedbe reakcije duže, to je i konverzija veća, ali ukoliko se reakcija provodi

duže od sto minuta, daljnja promjena konverzije je zanemariva, odnosno nakon tog vremena postiže se maksimalna konverzija (oko 68 %) određena koncentracijom limitirajućeg reaktanta, jer reaktanti na početku reakcije nisu u ekvimolarnom odnosu..

5.2. Cijevni reaktor

U cijevnom reaktoru konverzija raste s vremenom zadržavanja, τ (Slika 12). Pri vremenu zadržavanja od 100 minuta, konverzija iznosi 63,6 %, (Tablica 3). Pri višim vrijednostima vremena zadržavanja, nema znatnog povećanja konverzije, tako pri 5 puta većem vremenu zadržavanja, 500 minuta, konverzija iznosi 67,6 %, a iz grafičkog prikaza (Slika 12.b) može se zaključiti kako je u tom vremenu postignuto i stacionarno stanje.

U cijevnom reaktoru volumena 100 dm³ (Slika 14), konverzija raste povećanjem volumnog protoka. Da bi se postigla konverzija koja se postiže u kotlastom reaktoru za 100 minuta (63,6%) (Tablica 4), potreban je protok od 1 dm³min⁻¹. Pri protoku 0,8 dm³min⁻¹ konverzija iznosi 59,9% (Tablica 4), a vrijeme zadržavanja 125 minuta. Povećanjem protoka na 1,65 dm³min⁻¹ postiže se konverzija od 68,1% (Tablica 4), a vrijeme zadržavanja iznosi 60,6 minuta.

Na konverziju u cijevnom reaktoru utječe duljina reaktora te linearna brzina (Slika 14). Konverzija od 63,5% (Tablica 5) može se postići kod linearne brzine 0,09 dm min⁻¹ i duljine reaktora 5,6 dm. Pri linearnoj brzini 0,1 dm min⁻¹ potrebna je duljina reaktora 6,3 dm kako bi se postigla konverzija 63,7 % (Tablica 5). Kad se linearna brzina poveća dva puta, da bi se dobila približno ista vrijednost konverzije (63,2%) (Tablica 5), potrebno je dva puta povećati i duljinu. A za deset puta veću vrijednost linearne brzine, da bi konverzija bila 63,3 % (Tablica 5) potrebna je duljina reaktora 100 dm.

5.3. Protočno kotlasti reaktor

U protočno kotlastom reaktoru (Slika 15) za vrijeme zadržavanja 100 minuta, u vremenu od 100 minuta postigne se konverzija 44,1 % (Tablica 6). U vremenu od 1000 minuta pri istom vremenu zadržavanja, konverzija iznosi 0,001. Dakle na konverziju u protočno kotlastom reaktoru uvelike utječe nestabilnost (konstanta deaktivacije) enzima. Konverzija koja se postiže u kotlastom reaktoru za 100 minuta, te u cijevnom pri vremenu zadržavanja od 100 minuta, u protočno kotlastom se može postići jedino ukoliko promijenimo uvjete, npr. iznimnim povećanjem koncentracije enzima (Tablica 6).

6. ZAKLJUČAK

Reakciju aldolne adicije dihidroksiacetona (DHA) na N-Cbz-aminopropanal kataliziranu D-fruktoza-6-fosfat aldolazom A129G, najpogodnije je provoditi u kotlastom reaktoru jer se u tom reaktoru postiže najbolja konverzija koja ne ovisi o dimenzijama reaktora. Protočno kotlasti reaktor bio bi najlošiji izbor jer se u njemu postiže najmanja konverzija pri istim uvjetima koji se koriste i za cijevni i za kotlasti reaktor, te se u njemu najviše osjeti utjecaj konstante deaktivacije enzima. U ovom reaktoru je zbog toga potrebna i najveća koncentracija enzima da bi se ostvarila ista konverzija kao u kotlastom i cijevnom reaktoru. U cijevnom reaktoru mogu se postići visoke konverzije, međutim konverzija ovisi o dimenzijama reaktora, te je potrebno dobro uskladiti sve parametre kako bi se postigla željena konverzija.

7. POPIS SIMBOLA

K_m	Michaelis Menteničina konstanta,
FSA	D-fruktoza-6-fosfat aldolaza
DHA	dihidroksiaceton
DHAP	dihidroksiaceton fosfat
TAL	transaldolaze
t	vrijeme, min
V	volumen, dm^3
c	molarna koncentracija, mmol dm^{-3}
γ	koncentracija enzima, mg ml^{-1}
K_i	konstanta inhibicije, mmol dm^{-3}
τ	vrijeme zadržavanja, min
v_0	volumni protok , dm^3/min
l	duljina, dm
u	linearna brzina, dm min^{-1}

8. LITERATURA

- [1] Sugiyama, M., Hong, Z., Liang, P., Dean, S. M., Whalen, L. J., Greenberg, W. A., Wong, C., D-Fructose-6-Phosphate Aldolase - Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 14811-14817.
- [2] Takayama, S., McGarvey, G. J., Wong, C., Microbial aldolases and transketolases: New biocatalytic approaches to simple and complex sugars, Ann. Rev. Microbiol. 51 (1997) 285–310.
- [3] <https://sl.wikipedia.org/wiki/Biotransformacija> (pristup 24. ožujka 2016.)
- [4] Sudar M., Biokatalitička sinteza aldolnog produkta, prekursora D-fagomina, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015., str. 1, 9.
- [5] http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_biokemijsko_inzenjerstvo/laboratorij_za_tehnologiju_i_primjenu_stanica_i_biotransformacije/stereoselektivne_biotransformacije (pristup 24. ožujka 2016.)
- [6] Palomo J.M., Filice M., New emerging bio-catalysts design in biotransformations, Biotechnology Advances, 33, (2015) 605–613.
- [7] Barnard-Britson, S., Chi, X., Nonaka, K., Spork, A. P., Tibrewal, N., Goswami A., Pahari, P., Ducho, C., Rohr, J., Van Lanen, S. G., Amalgamation of Nucleosides and Amino Acids in Antibiotic Biosynthesis: Discovery of an L-Threonine:Uridine-5'-Aldehyde Transaldolase, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 18514–18517
- [8] Marić V., Šantek B., Biokemijsko inženjerstvo, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009., str. 27-29, 131, 132.
- [9] Pine S. H., Organska kemija [et al.] prevela Irena Ranogajec. 2. Promijenjeno izd., Školska knjiga, Zagreb, 1984., str. 277, 278, 815.
- [10] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Biokemija, prevoditelji: Weygand Đurašević, I., Jernej, B., Kućan, Ž., 6. izd., Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 206, 207, 217-225, 236-237.,
- [11] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/rules.html> (pristup 24. ožujka 2016.)
- [12] Hodzić Elvis, Hodzić Emine, Modeliranje i simulacija struktura kompleksnih proizvodnih sistema, Tehnički glasnik 8 (2014) 150-156.
- [13] http://powerlab.fsb.hr/DinamikaProcesa/Matmod_uvod_novo.pdf (pristup 24. ožujka 2016.)

- [14] https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/skripta_Bioreakcijska_tehnika_II_dio%5B1%5D%5B2%5D.pdf (pristup 24. ožujka 2016.)
- [15] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965030237> (pristup 24. ožujka 2016.)
- [16] <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm> (pristup, 21. travnja 2016.)
- [17] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383050078> (pristup, 21. travnja 2016.)
- [18] <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm> (pristup, 2. kolovoza 2016.)
- [19] <http://www.worthington-biochem.com/ald/default.html>, (pristup 21. travnja 2016.)
- [20] Samland, A. K., Sprenger G. A., Microbial aldolases as C–C bonding enzymes—unknown treasures and new developments; Appl Microbiol Biotechnol 71 (2006) 253–264
- [21] <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001585> (pristup, 2. kolovoza 2016.)
- [22] Sautner, V., Friedrich, M. M., Lehwess-Litzmann, A., Tittmann, K., Converting transaldolase into aldolase through swapping of the multifunctional acid-base catalyst, Common and divergent catalytic principles in F6P aldolase and transaldolase, Biochemistry, 54 (2015) 4475–4486.
- [23] Inoue, T., Microbial aldolases as C-C bonding enzymes: Investigation of structural-functional characteristics and application for stereoselective reactions, Disertacija, Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 2006., str. 8.
- [24] <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001585> (pristup 2. kolovoza 2016.)
- [25] Moehs, C. P., Allen, P. V., Friedman, M., Belknap, W. R., Cloning and expression of transaldolase from potato, Plant Molecular Biology 32 (1996) 447-452.
- [26] Kuhn, E., Brand, K., Purification and Properties of Transaldolase from Bovine Mammary Gland, Biochemistry, 11 (1972) 1767–1772.
- [27] Samland, A. K., Sprenger, G. A., Transaldolase: From biochemistry to human disease, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41 (2009) 1482–1494.
- [28] <https://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/pentose.htm>, (pristup, 2. kolovoza 2016.)
- [29] Vasić Rački, Đ., Industrial Biotransformations, Second, Completely Revised and Extended Edition, Edited by: Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006., str. 1-32.
- [30] Maysinger, D., Žanić-Grubišić, T., Kemijske osnove biotransformacije lijekova, Školska knjiga, Zagreb, 1989., str. 115, 116, 132, 136.; 179, 184, 200, 207, 214.

- [31] Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., Overview Reactors with Multi-enzyme Systems Chem. Biochem. Eng. Q. 23 (2009) 545–553.
- [32] Sudar, M., Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., Clapés, P., Lozanoc, C., Mathematical model for aldol addition catalyzed by two d-fructose-6-phosphate aldolases variants overexpressed in *E. coli*, Journal of Biotechnology 167 (2013) 191–200.
- [33] <http://www.raysahelian.com/dfagomine.html> (pristup, 2. kolovoza 2016.)
- [34] Amézqueta, S., Galán, E., Vila-Fernández, I., Pumarola, S., Carrascal, M., Abian, J., Ribas-Barba, L., Serra-Majem, L., Torres, J. L., The presence of D-fagomine in the human diet from buckwheat-based foodstuffs, Food Chemistry 136 (2013) 1316–1321.
- [35] Gomzi Z., Kemijski reaktori, HINUS, Zagreb, 1998., str. 27, 48, 56, 96, 97.
- [36] https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Skripta%5B2%5D.pdf, (pristup 30. kolovoza 2016.)
- [37] Warde, M., Mikroreaktori, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2010.
- [38] <http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matem%20modeliranje.pdf> (pristup 30. kolovoza 2016.)
- [39] <https://www.micromath.com/products.php?p=scientist> (pristup 30. kolovoza 2016.)
- [40] https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Peti_tjedan%5B4%5D.pdf (pristup 30. kolovoza 2016.)
- [41] Hublin A., Razvoj procesa i modeliranje anarobne razgradnje sirutke, Disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2012.

9. PRILOZI

9.1 Matematički model aldolne adicije u kotlastom reaktoru

// MicroMath Scientist Model File

IndVar:T,

DepVar: AL, DHA ALD, E, X

Params: KAL, KDHA, KALD, KIAL, VM1, VM2

//Matematički model

$R1 = (VM1 * AL * DHA * E) / ((KAL + AL) * (KDHA + DHA))$

$R2 = VM2 * ALD * E / (KALD * (1 + AL / KIAL) + ALD)$

$AL' = -R1 + R2$

$DHA' = -R1 + R2$

$ALD' = R1 - R2$

$E' = -kd * E$

$X = (DHA0 - DHA) / DHA0$

//Pocetne vrijednosti

T=0

AL= 14

AL0=14

DHA=12

DHA0 =12

ALD0=0

ALD=0

E=1.7

// Vrijednosti parametara

KAL = 24.34

KDHA = 50.12

KALD = 188.95

KIAL = 0.28

kd = 0.011

VM1 = 2.86

VM2 = 18.199

9.2 Matematički modeli aldolne adicije u cijevnom reaktoru

9.2.1 Matematički modeli aldolne adicije u cijevnom reaktoru uz nezvisnu varijablu τ

// MicroMath Scientist Model File

IndVar:Z,

DepVar: AL, DHA ALD, E, X

Params: KAL, KDHA, KALD, KIAL, VM1, VM2

//Matematički model

$R1 = (VM1 * AL * DHA * E) / ((KAL + AL) * (KDHA + DHA))$

$R2 = VM2 * ALD * E / (KALD * (1 + AL / KIAL) + ALD)$

$AL' = -R1 + R2$

$DHA' = -R1 + R2$

$ALD' = R1 - R2$

$E' = -kd * E$

$X = (DHA0 - DHA) / DHA0$

//Pocetne vrijednosti

Z=0

AL= 14

AL0=14

DHA=12

DHA0 =12

ALD0=0

ALD=0

E=1.7

// Vrijednosti parametara

KAL = 24.34

KDHA = 50.12

KALD = 188.95

KIAL = 0.28

kd = 0.011

VM1 = 2.86

VM2 = 18.199

9.2.2 Matematički model aldolne adicije u cijevnom reaktoru uz nezavisnu varijablu V

// MicroMath Scientist Model File

IndVars:V

DepVars: AL, DHA, ALD, E, X

Params: KAL, KDHA, KALD, KIAL, VM1, VM2,vo

//Matematički model

$R1 = (VM1 * AL * DHA * E) / ((KAL + AL) * (KDHA + DHA))$

$R2 = VM2 * ALD * E / (KALD * (1 + AL / KIAL) + ALD)$

$AL' = (-R1 + R2) * vo$

$DHA' = (-R1 + R2) * vo$

$ALD' = (R1 - R2) * vo$

$E' = -kd * E$

$X = (DHA0 - DHA) / DHA0$

//Pocetne vrijednosti

V=0

AL=14

AL0=14

DHA0=12

DHA=12

ALD0=0

ALD=0

E=1.7

vo=0.8

//Vrijednosti parametara

KAL=24.34

KDHA=50.12

KIAL=0.28

KALD=188.95

kd=0.011

VM1=2.86

VM2=18.199

9.2.3. Matematički model aldolne adicije u cijevnom reaktoru uz nezavisnu varijablu L

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: L

DepVars: AL, DHA, ALD, E, X

Params: KAL, KDHA, KALD, KIAL, VM1, VM2, u

//Matematički model

$R1 = (VM1 * AL * DHA * E) / ((KAL + AL) * (KDHA + DHA))$

$R2 = VM2 * ALD * E / (KALD * (1 + AL / KIAL) + ALD)$

$AL' = (-R1 + R2) / u$

$DHA' = (-R1 + R2) / u$

$ALD' = (R1 - R2) / u$

$E' = -kd * E$

$X = (DHA0 - DHA) / DHA0$

//Pocetne vrijednosti

L=0

AL=14

AL0=14

DHA0=12

DHA=12

ALD0=0

ALD=0

E=1.7

u=1

//Vrijednosti parametara

KAL=24.34

KDHA=50.12

KIAL=0.28

KALD=188.95

kd=0.011

VM1=2.86

VM2=18.199

9.2 Matematički model aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: T
DepVars: AL, DHA, ALD, E, X
Params: KAL, KDHA, KALD, KIAL, VM1, VM2

//Matematički model
R1=(VM1*AL*DHA*E)/((KAL+AL)*(KDHA+DHA))
R2=VM2*ALD*E/(KALD*(1+AL/KIAL)+ALD)
AL'=(AL0-AL)/TAU-R1+R2
DHA' =(DHA0-DHA)/TAU -R1+R2
ALD'=(ALD0-ALD)/TAU +R1-R2
E'=-kd*E
X=(DHA0-DHA)/DHA0

//Pocetne vrijednosti
T=0
AL=14
AL0=14
DHA0=12
DHA=12
ALD0=0
ALD=0
E=8

//Vrijednosti parametara
KAL=24.34
KDHA=50.12
KIAL=0.28
KALD=188.95
kd=0.011
VM1=2.86
VM2=18.199
TAU=100

***
```

10. ŽIVOTOPIS

Sanja Ivanušić rođena 1994. g. u Varaždinu, od 2000.g. do 2008.g. pohađala je Osnovnu školu Bisag, zatim upisuje Opću gimnaziju u Srednjoj školi Maruševac s pravom javnosti, dvije godine kasnije, 2010.g., upisuje Opću gimnaziju u Srednjoj školi Dragutina Stražimira, u Sv. Ivanu Zelini, te je završava 2012.g., iste godine upisuje Preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.